

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-194130  
 (43)Date of publication of application : 21.07.1999

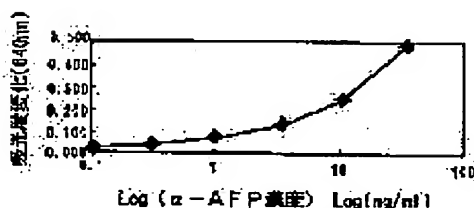
(51)Int.Cl. G01N 33/566  
 G01N 33/52

(21)Application number : 09-369574 (71)Applicant : HOGI MEDICAL:KK  
 (22)Date of filing : 26.12.1997 (72)Inventor : JO YOSHIO  
 INOUE TOSHIKI  
 TAKADA KOICHI

## (54) COLORING SENSOR USING POLYDIACETYLENE MEMBRANE

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an analytical system which makes use of a polyacetylene membrane, which can be used universally, by which various organism samples can be analyzed simply and with high sensitivity and in which the membrane can be manufactured easily. SOLUTION: A coloring sensor is formed in such a way that it is composed of fine particles covered with a polydiacetylene membrane liposome, with a polyacetylene membrane film or with a polydiacetylene membrane and that proteins whose molecule is made low are taken into the polydiacetylene membrane so as not to generate a hue change in the membrane. An analytical method uses the sensor. As a preferable state, the proteins whose molecule is made low are formed in such a way that an antibody Fab' fragment, an antigen protein having a molecular weight of 100000 or lower, a peptide which is composed of the residual group of 3 to 20 pieces of amino acids or single-stranded DNA having 100 bases or lower used to form



double-stranded DNA by hybridization with single-stranded DNA in a sample and an antibody which reacts with the double-stranded DNA and which does not react with the single-stranded DNA are combined. The hue change of the polydiacetylene membrane is generated by an antigen-antibody reaction with an analyte (a component to be inspected) in the sample, and the analyte can be analyzed with high sensitivity.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 20.02.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 08.05.2000

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

BEST AVAILABLE COPY

application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3138442

[Date of registration] 08.12.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2000-08252

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 06.06.2000

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIPF are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The coloring sensor characterized by incorporating the proteins which carried out depolymerize so that it might consist of the particle with which poly diacetylene film liposome, the poly diacetylene film film, or the poly diacetylene film was covered and color tone change might not be caused in the poly diacetylene film at this film.

[Claim 2] The coloring sensor of claim 1 characterized by for the proteins which carried out depolymerize being the Fab'fragmentation of an antibody, and being what carries out an antigen and an antibody reaction with the antigen contained in a specimen.

[Claim 3] The coloring sensor of claim 1 characterized by for the proteins which carried out depolymerize being with a molecular weight of 100,000 or less antigen proteins, and being what carries out an antigen and an antibody reaction with the antibody contained in a specimen.

[Claim 4] The coloring sensor of claim 1 characterized by for the proteins which carried out depolymerize being the peptides which consist of 3-20 amino acid residue, and being what carries out an antigen and an antibody reaction with the antibody contained in a specimen.

[Claim 5] 100 in which the proteins by which depolymerize was carried out carry out hybridization to the single stranded DNA in a specimen, and it forms the double stranded DNA Coloring sensor of claim 1 characterized by combining the antibody which does not react to a single stranded DNA although it reacts to the single stranded DNA and this double stranded DNA below a base.

[Claim 6] The analysis method of the biological material which the coloring sensor of either claim 1 - claim 5 is contacted in a specimen solution, and is characterized for color tone change of the poly diacetylene film by spectrometry or carrying out visual observation.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIPF are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the analysis method using the new coloring sensor and this sensor which consist of the poly diacetylene film, if it explains in full detail about the technique of analyzing the various ligands in a biological material (ANARAITO).

[0002]

[Description of the Prior Art] The film formed of the autoagglutination of an amphiphilic diacetylene molecule By carrying out UV (ultraviolet rays) exposure, it is polymer-ized and blue is presented. This poly diacetylene film Producing change of a color tone according to an operation of the rise of pH and temperature, dynamic stress, etc., and becoming red is known. (For example) Lipowsky and R. (1991) Nature 349, 475-481; Bloor and D. And Chance, R.R.(1985) Polydiacetylenes : Reference, such as NATO ASI Series E and Applied Science.

[0003] Recently, the attempt which applies the poly diacetylene film to a biosensor using this property is proposed (Charych and D.H. others). (1993) Science 261, 585-588 ; Others [ . / Reichert and / A], (1995) J.Am.Chem.Soc.115 and 1146-1147 (1995); Chemistry & Biology 3 besides Charych D.H. (1996), and 113-120 (1996). That is, it is the attempt which is going to build the biosensor which can detect ligand to high sensitivity using color tone change (blue -> red) produced when the poly diacetylene film is made to incorporate the acceptor which reacts to the disease germ which exists in a biological material, a virus, a toxin, etc. specifically and each acceptor combines with specific ligands (a disease germ, a virus, toxin, etc.). Here, by the approach proposed until now, sugar and a lipid were chiefly used as an acceptor.

[0004] However, the acceptor of the same number as the number of the classes of ligand which can apply such an approach only to detection of the ligand with which joint structure of an acceptor and ligand was clarified, and which the acceptor was identified, therefore it is going to detect is compounded, and it has the difficulty that it is thought that conquest that the preparation conditions of the poly diacetylene film must be examined to whenever [ the ] is impossible. Composition is very complicated to the acceptor which consists of sugar or a lipid, it has many things accompanied by difficulty, and has still many that have an inadequate color tone change in detection of ligand. for example, above Charych \*\* -- in the approach (Chemistry & Biology 3 and 113-119 (1996)) of depending, although ganglioside is made to incorporate as an acceptor for detecting an influenza virus Since color tone change of the poly diacetylene film resulting from association of the poly diacetylene film and an influenza virus is inadequate, the actuation with the film complicated [ if it kicks, will not become, but ] to preparation as a sensor which introduces sialic-acid poly diacetylene several% as an accelerator of a structural change is needed. Moreover, if the ligands which it is going to detect with a natural thing differ, it is necessary to also re-evaluate a structural change accelerator.

[0005] Furthermore, the conventional approach is effective only in the ligand which generally has the acceptor of 1000 or less molecular weight extent, and unsuitable for detecting the ligand which makes a macromolecule an acceptor. It is because color tone change will arise on the film only in it if the acceptor of a macromolecule is incorporated by the poly diacetylene film.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Using the poly diacetylene film, the purpose of this invention is flexible, is simple, can analyze various biological materials to high sensitivity, and is for membranous manufacture to also offer an analysis system new type [ easy ].

[0007]

[Means for Solving the Problem] this invention person drew a header and this invention for the above-mentioned purpose being attained by incorporating the poly diacetylene film in the comparatively low-molecular proteins which can react or interact with the ligand in a biological material (ANARAITO: test component). In this way, this invention consists of the particle with which poly diacetylene film liposome, the poly diacetylene film film, or the poly diacetylene film was covered, and offers the coloring

sensor characterized by incorporating the proteins which carried out depolymerize so that color tone change might not be caused in the poly diacetylene film at this film.

[0008] As a desirable mode, the proteins which carried out depolymerize in the coloring sensor of this invention are the Fab'fragmentation of an antibody, and it carries out an antigen and an antibody reaction with the antigen contained in a specimen. As another desirable mode, the proteins which carried out depolymerize in the coloring sensor of this invention are with a molecular weight of 100,000 or less antigen proteins, and it carries out an antigen and an antibody reaction with the antibody contained in a specimen. As still more nearly another desirable mode, the proteins which carried out depolymerize in the coloring sensor of this invention are the peptides which consist of 3-20 amino acid residue, and it carries out an antigen and an antibody reaction with the antibody contained in a specimen. Moreover, 100 in which the proteins by which depolymerize was carried out carry out hybridization to the single stranded DNA in a specimen, and it forms the double stranded DNA in the coloring sensor of this invention as another desirable mode. The antibody which does not react is combined with a single stranded DNA although it reacts to the single stranded DNA and this double stranded DNA below a base. Furthermore, this invention contacts the above-mentioned coloring sensor in a specimen solution, and offers the analysis method of the biological material characterized for color tone change of the poly diacetylene film by spectrometry or carrying out visual observation.

[0009]

[Embodiment of the Invention] The sensor of this invention enables high sensitivity detection of various ANARAITO (ligand) by making the proteins (antibody protein, antigen protein, a peptide, or a nucleic acid and antibody protein) by which depolymerize was carried out to the poly diacetylene film incorporate. This invention namely, by giving the structural change of extent which the poly diacetylene film is made to incorporate the proteins of low molecular weight comparatively, and does not cause color tone change on the poly diacetylene film. A structural change of the complex protein originating in an antigen and an antibody reaction when these proteins react with ANARAITO becomes very large. It is based on discovery that the color tone change accompanying destruction and it of the structure of the poly diacetylene film can be caught to high sensitivity, without introducing a structural change accelerator.

[0010] The sensor of this invention is applicable to the analysis of the system of arbitration based on an antigen and an antibody reaction. For example, in a Prior art, detection of all the ligands containing ligand undetectable since the acceptor is not identified is possible by producing the antibody (the antibody to any ligands is producible). Moreover, also about an antibody, even when the detail of the joint structure between this antibody and its acceptor is not clarified, it can detect by making the poly diacetylene film incorporate the antigen protein or antigen peptide with which causing the antibody, and an antigen and an antibody reaction is known. Furthermore, the sensor of this invention is applicable also to detection of a nucleic acid by combining with antibody protein so that it may mention later.

[0011] The sensor of this invention based on an antigen and an antibody reaction can be manufactured on the almost same conditions easy and by making the liposome of the poly diacetylene film, a film, or the poly diacetylene film covered on the particle incorporate proteins to stability, and moreover making it incorporate it quantitatively, even if target ANARAITO differs. For example, in order to manufacture the sensor of the liposome mold according to this invention, after forming the diacetylene film in a suitable organic solvent in the case of which, an organic solvent is removed and the poly diacetylene film with which these proteins were incorporated is obtained in the diacetylene film and the proteins of the specified quantity which were obtained by carrying out UV irradiation in the suitable buffer solution, after ultrasonically subsequently, churning and. What is necessary is to add a particle suitable in the buffer solution and just to perform same actuation, in order to obtain the sensor of the type with which proteins were incorporated by the poly diacetylene film covered on the particle. Moreover, what is necessary is to be immersed in the solution (buffer solution) containing the proteins of the specified quantity, and just to perform UV irradiation, after moving the film formed by the LB film (Langmuir Blodgett film) accumulating method according to the conventional method to a suitable base material, in order to prepare the sensor which consists of the poly diacetylene film film. Thus, the sensor of this invention can be fundamentally manufactured by above-mentioned actuation also in which analysis system, and the complicatedness that the preparation conditions of the poly diacetylene film must be examined whenever the target ligand (ANARAITO) changes is avoided.

[0012] One of the big advantages of the sensor of this invention is by having made the poly diacetylene film

incorporate an antibody to have enabled detection of all the ligands that exist in a nature fundamentally. By carrying out immunity to an animal according to a conventional method by using ligand (ANARAITO) used as a specimen as an antigen, it is because the antibody to this ligand is obtained simply. According to the purpose, both a polyclonal antibody and the monoclonal antibody of an antibody are usable. Such an antibody needs to carry out depolymerize so that color tone change may not be caused on this film, when incorporated by the poly diacetylene film. Although all antibodies may be able to be used for the sensor of this point and this invention, generally it is desirable to use antibody fragments, such as intact IgG, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab'. Since it is especially called low molecular weight more, Fab' fragmentation is desirable.

[0013] Carrying out an antigen and an antibody reaction with a specific antibody can also make the poly diacetylene film incorporate various kinds of clear proteins or peptides in the sensor of this invention, and it becomes it detectable [ this antibody ] by this. In this case, when incorporated by the poly diacetylene film, in order to make it not make this film cause color tone change, as for 100,000 or less molecular weight and a peptide, generally, what consists of 3-20 amino acid is desirable [ protein ]. As the protein which can be used for the sensor of this invention, or a peptide, the envelope protein (gp120) fragment 254-274 used for detection of a HIV (human immunodeficiency virus) antibody, the envelope protein (GP90) used for detection of a HCV (Homo sapiens mold virus) antibody can be mentioned.

[0014] The sensor of this invention is further applicable also to detection of a nucleic acid. For example, DNA incorporated by the diacetylene film and complementary DNA are detectable to high sensitivity by making the poly diacetylene film incorporate the single stranded DNA (for it to be 100 generally below base) which carries out hybridization to the single stranded DNA in a specimen, and forms the double stranded DNA, and the antibody which does not react to a single stranded DNA although it reacts to this double stranded DNA. This sensor is based on having solved by using together the antibody which reacts specifically the problem which cannot cause color tone change of the poly diacetylene film with the double stranded DNA only by formation of the double stranded DNA. Such a double-stranded-DNA specific antibody can also be easily manufactured by carrying out immunity of this double stranded DNA to a suitable animal.

[0015] color tone change which originates in an antigen and an antibody reaction with the proteins incorporated by the poly diacetylene film like the above statement, and the ligand in a specimen (ANARAITO) if the sensor of this invention is used -- the various ligands in a living body (active ingredients originating in them, such as a disease germ, a virus, and a toxin, further various kinds of physiological active substances, etc.) -- quality -- and quantitative analysis can be carried out. Although it is common that the spectrometry which uses a spectrophotometer performs, analysis is good also by visual observation, when making qualitative analysis into a key objective. Especially when using as a film type sensor, a suitable base material like paper or a thin sheet plastic can be made to be able to support this film, it can be immersed in specimen liquid like litmus paper, and existence of a test component can also be known simple from extent of the coloring (color tone change).

[0016] When using the sensor of this invention for quantitative analysis, generally it is used on a particle from the ease on handling, or the point of sensibility with the gestalt with which the poly diacetylene film was covered. In this case, as for an example desirable as a particle, polystyrene, the Pori fluororesin, etc. are mentioned. Moreover, generally the particle size of a particle is 0.01-1.0. Being referred to as mum is desirable.

[0017]

[Example] This invention is not restricted by these examples, although an example is shown in order to clarify the description of this invention further below.

Example 1: Make the liposome of the diacetylene film incorporate Fab' of the anti-Homo sapiens alpha-fetoprotein antibody which carried out depolymerize, and detect a specific antigen to high sensitivity. Chloroform: 100ml of organic solvents of methanol =2:1 0.1-2mg/ml Diacetylene is melted so that it may become concentration, and it is the capacity of 500ml. It put into glass KORUBEN, and the organic solvent was removed at 25 degrees C, rotating KORUBEN so that the diacetylene film may be made into homogeneity on a glass front face. one - 20 -- micro -- g -- /-- ml -- concentration -- anti- -- Homo sapiens -- alpha fetoprotein -- an antibody -- Fab -- ' -- containing -- tris - HCl -- the buffer solution (pH8.0) -- 50 -- ml -- adding -- ten -- a minute -- between -- intense -- agitating -- further -- ultrasonicing -- a solution -- homogeneity -- carrying out -- the purpose -- \*\* -- carrying out -- anti- -- Homo sapiens -- alpha fetoprotein -- an antibody -- Fab -- ' -- having incorporated -- poly -- diacetylene -- the film -- liposome -- 50 -- ml --

having prepared . UV irradiation was carried out to this and diacetylene was polymer-ized. The alpha fetoprotein (alpha-AFP) (it is set to 0.1 to 100 ng/ml like) of various concentration is added to 1ml of this 0.2mg [ /ml ] liposome solution, and it is 640nm with a spectrophotometer (Beckmann ultraviolet visible a spectrum analysis-system DV- 640). Change of an absorbance was measured. Although the result was shown in Table 1 and drawing 1 , a quantitive and remarkable absorbance change of an absorbance was extremely accepted over the low-concentration large range.

[0018]

[Table 1]

| $\alpha$ - A F P の濃度 (ng/ml) | 吸光度変化 |
|------------------------------|-------|
| 0                            | 0.000 |
| 0.1                          | 0.015 |
| 0.3                          | 0.028 |
| 1.0                          | 0.061 |
| 3.3                          | 0.118 |
| 10                           | 0.232 |
| 33                           | 0.478 |
| 100                          |       |

[0019] Example 2: Make the particle which covered the diacetylene film incorporate Fab' of the anti-Homo sapiens alpha-fetoprotein antibody which carried out depolymerize, and detect a specific antigen to high sensitivity. Chloroform: 100ml of solvents of methanol =2:1 0.1-10mg/ml Diacetylene is melted so that it may become concentration, and it is the capacity of 500ml. It put into glass KORUBEN, and the organic solvent was removed at 25 degrees C, rotating KORUBEN so that the diacetylene film may be made into homogeneity on a glass front face. polystyrene latex of 10 - 200 mum 45ml (pH8.0) of tris-HCl buffer solutions and particle size 0.212 (SERADAIN --) containing Fab' of the anti-Homo sapiens alpha-fetoprotein antibody of mug/ml concentration Add 5ml of American 0.5 % (w/w) liquid to coincidence, agitate it violently for 10 minutes, and it is ultrasonicated for 3 more minutes. Homogeneity was made to distribute suspension and poly diacetylene film covering polystyrene latex 50ml which incorporated Fab' of the anti-Homo sapiens alpha-fetoprotein antibody made into the purpose was prepared. UV irradiation was carried out to this and diacetylene was polymer-ized. It is 100 with this latex suspension water. It double-dilutes, the Homo sapiens alpha fetoprotein (alpha-AFP) (it is set to ten to 1000 pg/ml like) of various concentration is added to 1ml of this dilution suspension, and it is 640nm with a spectrophotometer. Change of an absorbance was measured. Although the result was shown in Table 2 and drawing 2 , it was checked that the quantitative analysis of high sensitivity is possible.

[0020]

[Table 2]

| $\alpha$ - A F P の濃度 (pg/ml) | 吸光度変化 |
|------------------------------|-------|
| 0                            | 0.000 |
| 10                           | 0.040 |
| 33                           | 0.082 |
| 100                          | 0.162 |
| 330                          | 0.331 |
| 1000                         | 0.701 |

[0021] Example 3: Make a diacetylene film film incorporate Fab' of anti-Homo sapiens's fetoprotein antibody which carried out depolymerize, and detect a specific antigen to high sensitivity. Chloroform: 100ml of solvents of methanol =2:1 0.1-10.0mg/ml Diacetylene was melted so that it might become concentration, and it extended to Langmuir-pro jet film accumulation equipment. The formed film was moved to the glass covered with octyl trichlorosilane. this poly diacetylene (pH8.0) film -- 0.7x2.5cm the

film of size -- 1mg/ml concentration -- anti- -- Homo sapiens -- alpha fetoprotein -- an antibody -- 0.1 -- M -- a phosphoric acid -- a buffer -- dipping -- four -- degree C -- one -- an hour -- reacting -- making -- Fab -- ' -- containing -- anti- -- Homo sapiens -- alpha fetoprotein -- an antibody -- Fab -- ' -- having incorporated -- poly -- diacetylene -- the film -- having prepared . Furthermore, it polymer-ized by UV irradiation. 0.1M phosphoric-acid buffer 20micro containing the Homo sapiens alpha fetoprotein (alpha-AFP) (0.1 to 100mg/ml of concentration) of concentration various on this film -- 1 in addition, change of a color tone was observed in viewing. Although the result was shown in Table 3, having carried out qualitative analysis by visual observation from low concentration extremely was admitted.

[0022]

[Table 3]

| $\alpha$ - A F P の濃度 (ng/ml) | 色の変化 |
|------------------------------|------|
| 0<br>(バッファーのみ)               | 無    |
| 0.1                          | 有    |
| 0.33                         | 有    |
| 1.0                          | 有    |
| 3.3                          | 有    |
| 10                           | 有    |
| 33                           | 有    |
| 100                          | 有    |

[0023] Example 4: Make the liposome of the diacetylene film incorporate the envelope protein (gp120) fragment 254-274 (Cys-Thr-His-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Leu-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Glu) of HIV, and detect a HIV antibody to high sensitivity. Chloroform: 100ml of organic solvents of methanol =2:1 0.1-2mg/ml Diacetylene is melted so that it may become concentration, and it is the capacity of 500ml. It put into glass KORUBEN, and the organic solvent was removed at 25 degrees C, rotating KORUBEN so that the diacetylene film may be made into homogeneity on a glass front face. Envelope protein (gp120) fragment 254-274 of HIV of 1-20microg [ /ml ] concentration Envelope protein (gp120) fragment 254-274 of HIV which adds 50ml (pH8.0) of included tris-HCl buffer solutions, stirs violently for 10 minutes, ultrasonicates further, makes a solution homogeneity, and is made into the purpose Incorporated diacetylene film liposome 50ml was prepared. UV irradiation was carried out to this and diacetylene was polymer-ized. The inactivation HIV (it is set to 0.1 to 1000 pg/ml like) of various concentration is added to 1ml of this 0.2mg [ /ml ] liposome solution, and it is 640nm with a spectrophotometer (Beckmann ultraviolet visible a spectrum analysis-system DV- 640). Change of an absorbance was measured. A result is shown in Table 4 and drawing 3 .

[0024]

[Table 4]

| H I V の濃度 (pg/ml) | 吸光度変化 |
|-------------------|-------|
| 0                 | 0.000 |
| 1.0               | 0.018 |
| 3.0               | 0.032 |
| 10                | 0.078 |
| 33                | 0.152 |
| 100               | 0.311 |
| 330               | 0.641 |
| 1000              |       |

[0025] Example 5: Make the particle which covered the diacetylene film incorporate the envelope protein (gp120) fragment 254-274

(Cys-Thr-His-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Leu-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Glu) of HIV, and detect a HIV antibody to high sensitivity. Chloroform: 100ml of solvents of methanol =2:1 0.1-10mg/ml Diacetylene is melted so that it may become concentration, and it is the capacity of 500ml. It put into glass KORUBEN, and the organic solvent was removed at 25 degrees C, rotating KORUBEN so that the diacetylene film may be made into homogeneity on a glass front face. polystyrene latex of 1-200 Envelope protein (gp120) fragment 254-274 of HIV of mug/ml concentration 45ml (pH8.0) of tris-HCl buffer solutions and particle size 0.212 which are included mum (SERADAIN --) Add 5ml (w/w) of American 0.5% liquid to coincidence, stir it violently for 10 minutes, and it is ultrasonicated for 3 more minutes. Envelope protein (gp120) fragment 254-274 of HIV which homogeneity is made to distribute suspension and is made into the purpose Incorporated diacetylene film polystyrene latex 50ml was prepared. UV irradiation was carried out to this and diacetylene was polymer-ized. It is 100 with this latex suspension water. It double-dilutes, the inactivation HIV (it is set to 0.1 to 10 pg/ml like) of various concentration is added to 1ml of this dilution suspension, and it is 640nm with a spectrophotometer. Change of an absorbance was measured. A result is shown in Table 5 and drawing 4.

[0026]

[Table 5]

| H I V の濃度 (pg/ml) | 吸光度変化 |
|-------------------|-------|
| 0                 | 0.000 |
| 0.1               | 0.040 |
| 0.3               | 0.082 |
| 1.0               | 0.162 |
| 3.3               | 0.331 |
| 10                | 0.701 |

[0027] Example 6: Make a diacetylene film film incorporate the envelope protein (gp120) fragment 254-274 (Cys-Thr-His-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Leu-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Glu) of HIV, and detect a HIV antibody to high sensitivity. Chloroform: 100ml of solvents of methanol =2:1 0.1-10.0mg/ml Diacetylene is melted so that it may become concentration, and it extends to Langmuir Blodgett film accumulation equipment. The formed film was moved to the glass covered with octyl trichlorosilane. It is 0.7x2.5cm about this diacetylene (pH8.0) film. It is 1mg/ml to the film of size. Envelope protein (gp120) fragment 254-274 of HIV of concentration Dip in a 0.1M phosphoric-acid buffer, and it is made to react at 4 degrees C for 1 hour, and is the envelope protein (gp120) fragment 254-274 of HIV. The incorporated diacetylene film was prepared. Furthermore, it polymer-ized by UV irradiation. 0.1M phosphoric-acid buffer 20micro containing the envelope protein (gp120) fragment 254-274 (ten to 10000 pg/ml concentration) of HIV of concentration various on this film -- 1 in addition, change of a color tone was observed in viewing. A result is shown in Table 6.

[0028]

[Table 6]

| H I V の濃度 (pg/ml) | 色の変化 |
|-------------------|------|
| 0.0<br>(バッファーのみ)  | 無    |
| 10                | 有    |
| 33                | 有    |
| 100               | 有    |
| 330               | 有    |
| 1000              | 有    |
| 3300              | 有    |
| 10000             | 有    |



[0029] Example 7: Make the poly diacetylene film incorporate a deoxy nucleotide (DNA), and detect specific DNA in a specimen simple to high sensitivity. 20microl The liquid containing the specimen DNA (ATACGAAGGCCGAGCATACA) which reacts to the poly diacetylene film film which incorporated the probe DNA (the number of bases: 20mers, TATGCTTCCGCTCGTATGT) of various amounts (0.1 -100pg) prepared according to the approach of an example 3 complementary was added. Color tone change was not seen at all. Next, 20microl, in addition color tone change 60 seconds after were observed for the antibody (10microg/(ml)) only reacted to the double stranded DNA in viewing. A result is shown in Table 7. The result of Table 7 shows that it is high sensitivity and that it is quickly detectable simple for the inside DNA of a specimen by using the antibody which reacts to the double stranded DNA specifically.

[0030]

[Table 7]

| 検体DNAの量(μg) | 2本鎖DNAに対する<br>抗体添加前の色調変化 | 2本鎖DNAに対する<br>抗体添加後の色調変化 |
|-------------|--------------------------|--------------------------|
| 0           | 無                        | 無                        |
| 0.1         | 無                        | 有                        |
| 0.3         | 無                        | 有                        |
| 1.0         | 無                        | 有                        |
| 3.3         | 無                        | 有                        |
| 10          | 無                        | 有                        |
| 33          | 無                        | 有                        |
| 100         | 無                        | 有                        |

[0031]

[Effect of the Invention] much ligand containing the ligand (ANARAITO) which the sensor of this invention which consists of the poly diacetylene film is flexible, and was not able to be detected conventionally -- high sensitivity -- and it is detectable simple. The coloring sensor of this invention can be easily manufactured on the same conditions, even if the target ligands differ.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the graph which shows the result of a detection trial of alpha-AFP using the poly diacetylene film liposome according to this invention.

[Drawing 2] It is the graph which shows the result of a detection trial of alpha-AFP using the poly diacetylene film covering polystyrene latex according to this invention.

[Drawing 3] It is the graph which shows the result of a detection trial of the HIV antibody using the poly diacetylene film liposome according to this invention.

[Drawing 4] It is the graph which shows the result of a detection trial of the HIV antibody using the poly diacetylene film covering polystyrene latex according to this invention.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-194130

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月21日

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

G 0 1 N 33/566  
33/52

識別記号

F I

G 0 1 N 33/566  
33/52

A

審査請求 有 請求項の数 6 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-369574

(22) 出願日 平成9年(1997) 12月26日

(71) 出願人 00013/052

株式会社ホギメディカル  
東京都文京区湯島1丁目12番4号

(72) 発明者 徐 吉夫

東京都文京区湯島1丁目12番4号 株式会  
社ホギメディカル内

(72) 発明者 井上 利樹

東京都文京区湯島1丁目12番4号 株式会  
社ホギメディカル内

(72) 発明者 高田 敏一

東京都文京区湯島1丁目12番4号 株式会  
社ホギメディカル内

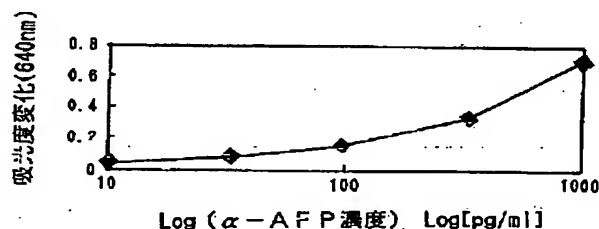
(74) 代理人 弁理士 筒井 知

(54) 【発明の名称】 ポリジアセチレン膜を用いる発色センサー

(57) 【要約】

【課題】 ポリジアセチレン膜を利用して、汎用性があり簡便で高感度に各種生体試料を分析することができ、膜の製造も容易な分析システムを提供する。

【解決手段】 ポリジアセチレン膜リボソーム、ポリジアセチレン膜フィルムまたはポリジアセチレン膜が被覆された微粒子から成り、ポリジアセチレン膜に該膜に色調変化を引き起こさないように低分子化した蛋白類が取り込まれている発色センサー、および該センサーを使用する分析法。好ましい態様として、低分子化した蛋白類は、抗体のFab<sup>+</sup>フラグメント、分子量10万以下の抗原蛋白、3~20個のアミノ酸残基から成るペプチド、または、検体中の1本鎖DNAとハイブリダイゼーションして2本鎖DNAを形成する100塩基以下の1本鎖DNAと、該2本鎖DNAに反応するが1本鎖DNAには反応しない抗体とを組み合わせたものであり、検体中のアナライト(被検成分)と抗原・抗体反応してポリジアセチレン膜の色調変化を引き起こして該アナライトを高感度に分析することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリジアセチレン膜リボソーム、ポリジアセチレン膜フィルムまたはポリジアセチレン膜が被覆された微粒子から成り、ポリジアセチレン膜に該膜に色調変化を引き起こさないように低分子化した蛋白類が取り込まれていることを特徴とする発色センサー。

【請求項2】 低分子化した蛋白類が、抗体のFabフラグメントであり、検体中に含まれる抗原と抗原・抗体反応するものであることを特徴とする請求項1の発色センサー。

【請求項3】 低分子化した蛋白類が、分子量10万以下の抗原蛋白であり、検体中に含まれる抗体と抗原・抗体反応するものであることを特徴とする請求項1の発色センサー。

【請求項4】 低分子化した蛋白類が、3～20個のアミノ酸残基から成るペプチドであり、検体中に含まれる抗体と抗原・抗体反応するものであることを特徴とする請求項1の発色センサー。

【請求項5】 低分子化された蛋白類が、検体中の1本鎖DNAとハイブリダイゼーションして2本鎖DNAを形成する100塩基以下の1本鎖DNAと、該2本鎖DNAに反応するが1本鎖DNAには反応しない抗体とを組み合わせたものであることを特徴とする請求項1の発色センサー。

【請求項6】 請求項1～請求項5のいずれかの発色センサーを検体溶液と接触させて、ポリジアセチレン膜の色調変化を吸光度測定または目視観察することを特徴とする生体試料の分析法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体試料中の各種リガンド（アナライト）を分析する技術に関し、詳述すれば、ポリジアセチレン膜から成る新規な発色センサーおよび該センサーを用いる分析法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】両親媒性のジアセチレン分子の自己凝集によって形成された膜は、UV（紫外線）照射することによりポリマー化されて青色を呈し、このポリジアセチレン膜は、pH、温度の上昇、力学的ストレス等の作用により色調の変化を生じ赤色になることが知られている（例えば、Lipowsky, R. (1991) *Nature* 349, 475-481; Bloor, D. および Chance, R. R. (1985) *Polydiacetylenes: NATO ASI Series E, Applied Science* 等参照）。

【0003】最近、この性質を利用してポリジアセチレン膜をバイオセンサーに応用する試みが提案されている（Charych, D. H. 他、(1993) *Science* 261, 585-588; Reichert, A. 他、(1995) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 1146-1147 (1995); Charych D. H. 他、(1996) *Chemistry & Biology* 3, 113-120 (1996)）。すなわち、生体試料中

に存在する病原菌、ウイルス、毒素等に特異的に反応する受容体をポリジアセチレン膜に取り込ませておき、各受容体が特異的なリガンド（病原菌、ウイルス、毒素等）と結合したときに生じる色調変化（青色→赤色）を利用してリガンドを高感度に検出できるバイオセンサーを構築しようとする試みである。ここで、これまで提案されていた方法では受容体として専ら糖質や脂質が用いられていた。

【0004】しかしながら、このような方法は、受容体とリガンドとの結合構造が明らかにされて受容体が同定されたリガンドの検出にしか適用できず、したがって、検出しようとするリガンドの種類の数と同じ数の受容体を合成して、そのたびにポリジアセチレン膜の調製条件を検討しなければならないという克服不可能と思われる難点を有する。糖質や脂質から成る受容体には、合成が非常に複雑で困難を伴うものが多く、さらに、リガンドの検出に当たって色調変化が不十分なものが多い。例えば、上記のCharych らによる方法（*Chemistry & Biology* 3, 113-119 (1996)）においては、インフルエンザウイルスを検出するための受容体としてガングリオシドを取り込ませているが、ポリジアセチレン膜とインフルエンザウイルスの結合に起因するポリジアセチレン膜の色調変化が不十分であるため、構造変化の促進剤としてシアル酸ポリジアセチレンを数%導入しなければならず、センサーとしての膜の調製に煩雑な操作を必要とする。また、当然のことながら、検出しようとするリガンドが異なれば、構造変化促進剤も再検討する必要がある。

【0005】さらに、従来の方法は、一般に分子量千以下程度の受容体をもつリガンドのみに有効であり、巨大分子を受容体とするリガンドを検出するのには不向きである。なぜなら、巨大分子の受容体がポリジアセチレン膜に取り込まれるとそれだけで膜に色調変化が生じるからである。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ポリジアセチレン膜を利用して、汎用性があり簡便で高感度に各種生体試料を分析することができ、膜の製造も容易な新しいタイプの分析システムを提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、生体試料中のリガンド（アナライト：被検成分）と反応または相互作用し得る比較的低分子の蛋白類をポリジアセチレン膜を取り込むことにより上記の目的が達成されることを見出し、本発明を導き出した。かくして、本発明は、ポリジアセチレン膜リボソーム、ポリジアセチレン膜フィルムまたはポリジアセチレン膜が被覆された微粒子から成り、ポリジアセチレン膜に該膜に色調変化を引き起こさないように低分子化した蛋白類が取り込まれていることを特徴とする発色センサーを提供する。

【0008】好ましい態様として、本発明の発色センサ

一においては、低分子化した蛋白類が、抗体のFab<sup>+</sup>フラグメントであり、検体中に含まれる抗原と抗原・抗体反応するものである。別の好ましい態様として、本発明の発色センサーにおいては、低分子化した蛋白類が、分子量10万以下の抗原蛋白であり、検体中に含まれる抗体と抗原・抗体反応するものである。さらに別の好ましい態様として、本発明の発色センサーにおいては、低分子化した蛋白類が、3~20個のアミノ酸残基から成るペプチドであり、検体中に含まれる抗体と抗原・抗体反応するものである。また、別の好ましい態様として、本発明の発色センサーにおいては、低分子化された蛋白類が、検体中の1本鎖DNAとハイブリダイゼーションして2本鎖DNAを形成する100塩基以下の1本鎖DNAと、該2本鎖DNAに反応するが1本鎖DNAには反応しない抗体とを組み合わせたものである。さらに、本発明は、上記の発色センサーを検体溶液と接触させて、ポリジアセチレン膜の色調変化を吸光度測定または目視観察することの特徴とする生体試料の分析法を提供する。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】本発明のセンサーは、ポリジアセチレン膜に低分子化された蛋白類(抗体蛋白、抗原蛋白、ペプチド、または核酸と抗体蛋白)を取り込ませることにより、各種アナライト(リガンド)の高感度検出を可能にしたものである。すなわち、本発明は、ポリジアセチレン膜に比較的分子量の蛋白類を取り込ませてポリジアセチレン膜に色調変化を起こさない程度の構造変化を与えておくことにより、該蛋白類がアナライトと反応したときの抗原・抗体反応に由来する複合体蛋白の構造変化が非常に大きくなり、構造変化促進剤を導入することなく、ポリジアセチレン膜の構造の破壊とそれに伴う色調変化を高感度に捉えることができるという発見に基づくものである。

【0010】本発明のセンサーは、抗原・抗体反応に基づく任意の系の分析に適用することができる。例えば、従来の技術では受容体が同定されていないために検出できないリガンドを含む全てのリガンドの検出が、その抗体を作製することにより可能である(どのようなリガンドに対する抗体も作製可能である)。また、抗体についても、該抗体とその受容体との間の結合構造の詳細が明らかにされていない場合でも、その抗体と抗原・抗体反応を起こすことが知られている抗原蛋白または抗原ペプチドをポリジアセチレン膜に取り込ませることにより検出することができる。さらに、本発明のセンサーは、後述するように抗体蛋白と組み合わせることにより、核酸の検出にも適用することができる。

【0011】抗原・抗体反応に基づく本発明のセンサーは、対象となるアナライトが異なってもほぼ同一の条件で簡単且つ安定に、蛋白類をポリジアセチレン膜のリボソームもしくはフィルム、または微粒子上に被覆されたポリジアセチレン膜に取り込ませ、しかも定量的に

取り込ませることにより製造することができる。例えば、本発明に従うリボソーム型のセンサーを製造するには、いずれの場合においても、適当な有機溶媒中でジアセチレン膜を形成した後、有機溶媒を除去し、得られたジアセチレン膜と所定量の蛋白類とを適当な緩衝液中で攪拌、次いで超音波処理した後、UV照射をすることにより、該蛋白類が取り込まれたポリジアセチレン膜が得られる。微粒子上に被覆されたポリジアセチレン膜に蛋白類が取り込まれたタイプのセンサーを得るには、緩衝液中に適当な微粒子を添加して同様の操作を行えばよい。また、ポリジアセチレン膜フィルムから成るセンサーを調製するには、常法に従いLB膜(ラングミュアー・プロジェット膜)累積法により形成したフィルムを適当な支持体に移した後、所定量の蛋白類を含む溶液(緩衝液)に浸漬し、UV照射を行えばよい。このように、本発明のセンサーは、いずれの分析系においても、基本的に上述の操作によって製造することができ、目的のリガンド(アナライト)が変わるたびにポリジアセチレン膜の調製条件を検討しなければならないという煩雑さは回避される。

【0012】本発明のセンサーの大きな利点の1つは、ポリジアセチレン膜に抗体を取り込ませたことにより、基本的には自然界に存在する全てのリガンドの検出を可能にしたことにある。被検対象となるリガンド(アナライト)を抗原として常法に従い動物に免疫することによって、該リガンドに対する抗体が簡単に得られるからである。抗体は、目的に応じてポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれも使用可能である。このような抗体は、ポリジアセチレン膜に取り込まれたときに該膜に色調変化を起こさないように低分子化されていることが必要である。この点、本発明のセンサーに全抗体を使用できる場合もあるが、一般的には、インタクトIgG、F(ab')<sub>2</sub>、Fab<sup>+</sup>などのような抗体フラグメントを使用することが好ましい。特に、より低分子量という理由からFab<sup>+</sup>フラグメントが好ましい。

【0013】本発明のセンサーには、特定の抗体と抗原・抗体反応することが明らかな各種の蛋白またはペプチドをポリジアセチレン膜に取り込ませることもでき、これによって該抗体の検出が可能となる。この場合、ポリジアセチレン膜に取り込まれたときに該膜に色調変化を起こさせないようにするためには、一般に、蛋白は分子量10万以下、また、ペプチドは3~20個のアミノ酸から成るものが好ましい。本発明のセンサーに使用できる蛋白またはペプチドとしては、HIV(ヒト免疫不全ウイルス)抗体の検出に用いられるエンベロウ蛋白(gp120)断片254-274や、HCV(ヒト型ウイルス)抗体の検出に用いられるエンベロウ蛋白(gp90)などを挙げることができる。

【0014】本発明のセンサーは、さらに核酸の検出にも適用することができる。例えば、検体中の1本鎖DN

Aとハイブリダイゼーションして2本鎖DNAを形成する1本鎖DNA（一般に100塩基以下）と、該2本鎖DNAには反応するが1本鎖DNAには反応しない抗体とをポリジアセチレン膜に取り込ませることにより、ジアセチレン膜に取り込まれたDNAと相補的なDNAを高感度に検出することができる。このセンサーは、2本鎖DNAの形成だけではポリジアセチレン膜の色調変化を起こすことはできない問題を2本鎖DNAと特異的に反応する抗体を併用することにより解決したことに基づく。そのような2本鎖DNA特異的抗体も、該2本鎖DNAを適当な動物に免疫することにより簡単に製造することができる。

【0015】本発明のセンサーを用いれば、叙上のようにポリジアセチレン膜に取り込まれた蛋白類と検体中のリガンド（アナライト）との抗原・抗体反応に起因する色調変化により、生体中の各種リガンド（病原菌、ウイルス、毒素等またはそれらに由来する活性成分、さらには各種の生理活性物質等）を定性および定量分析することができる。分析は、分光光度計を用いる吸光度測定により行うのが一般的であるが、定性分析を主目的とするような場合は目視観察によってもよい。特に、フィルムタイプのセンサーとして用いるような場合は、該フィルムを紙や薄いプラスチックシートのような適当な支持体に担持させリトマス試験紙のように検体液に浸漬して、その発色（色調変化）の程度から被検成分の存在を簡便に知ることもできる。

【0016】本発明のセンサーを定量分析に用いる場合には、取扱い上の容易さや感度の点から、一般に、微粒子上にポリジアセチレン膜が被覆された形態で用いられる。この場合、微粒子として好ましい例は、ポリスチレ

ン、ポリフッ素樹脂、などが挙げられる。また、微粒子の粒径は、一般に、0.01～1.0  $\mu\text{m}$ とするのが好ましい。

#### 【0017】

【実施例】以下に本発明の特徴をさらに明らかにするため実施例を示すが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

実施例1：低分子化した抗ヒト $\alpha$ -フェトプロテイン抗体のFab<sup>+</sup>をジアセチレン膜のリボソームに取り込ませ、特定の抗原を高感度に検出する。クロロホルム：メタノール＝2：1の有機溶媒100mlに0.1～2mg/mlの濃度になるようにジアセチレンを溶かし、容量500mlガラスコルベンに入れ、ガラス表面に均一にジアセチレン膜ができるようにコルベンを回転させながら25℃で有機溶媒を除去した。1～20  $\mu\text{g/ml}$ 濃度の抗ヒト $\alpha$ -フェトプロテイン抗体のFab<sup>+</sup>を含むトリス-HCl緩衝液（pH8.0）50mlを加え、10分間激しく攪拌し、さらに超音波処理し、溶液を均一にし目的とする抗ヒト $\alpha$ -フェトプロテイン抗体Fab<sup>+</sup>を取り込んだポリジアセチレン膜リボソーム50mlを調製した。これにUV照射してジアセチレンをポリマー化した。この0.2mg/mlのリボソーム溶液1mlに種々な濃度の $\alpha$ -フェトプロテイン（ $\alpha$ -AFP）（0.1～100ng/mlになるように）を加え、分光光度計（ベックマン社製紫外可視分光解析システムDV-640）で640nmの吸光度の変化を測定した。結果を表1と図1に示すが、極めて低濃度における広い範囲にわたって吸光度の定量的且つ顕著な吸光度変化が認められた。

#### 【0018】

【表1】

| $\alpha$ -AFPの濃度 (ng/ml) | 吸光度変化 |
|--------------------------|-------|
| 0                        | 0.000 |
| 0.1                      | 0.015 |
| 0.3                      | 0.028 |
| 1.0                      | 0.061 |
| 3.3                      | 0.118 |
| 10                       | 0.232 |
| 33                       | 0.478 |
| 100                      |       |

【0019】実施例2：低分子化した抗ヒト $\alpha$ -フェトプロテイン抗体のFab<sup>+</sup>をジアセチレン膜を被覆した微粒子に取り込ませ、特定の抗原を高感度に検出する。クロロホルム：メタノール＝2：1の溶媒100mlに0.1～10mg/mlの濃度になるようにジアセチレンを溶かし、容量500mlガラスコルベンに入れ、ガラス表面に均一にジアセチレン膜ができるようにコルベンを回転させながら25℃で有機溶媒を除去した。10～200  $\mu\text{g/ml}$ 濃度の抗

ヒト $\alpha$ -フェトプロテイン抗体のFab<sup>+</sup>を含むトリス-HCl緩衝液（pH8.0）45mlと粒径0.212  $\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス（セラダイン社、アメリカ）の0.5%（w/w）液5mlを同時に加え、10分間激しく攪拌し、さらに3分間超音波処理して、懸濁液を均一に分散させ、目的とする抗ヒト $\alpha$ -フェトプロテイン抗体のFab<sup>+</sup>を取り込んだポリジアセチレン膜被覆ポリスチレンラテックス50mlを調製した。これにUV照射しジアセチレン

をポリマー化した。このラテックス懸濁液で100倍希釈し、この希釈懸濁液1mlに種々な濃度のヒト $\alpha$ -フェトプロテイン( $\alpha$ -AFP)(10~1000pg/mlになるように)を加え、分光光度計で640nmの吸光度の変化を測

定した。結果を表2と図2に示すが、高感度の定量分析が可能であることが確認された。

【0020】

【表2】

| $\alpha$ -AFPの濃度 (pg/ml) | 吸光度変化 |
|--------------------------|-------|
| 0                        | 0.000 |
| 10                       | 0.040 |
| 33                       | 0.082 |
| 100                      | 0.162 |
| 330                      | 0.331 |
| 1000                     | 0.701 |

【0021】実施例3：低分子化した抗ヒトのフェトプロテイン抗体のFab<sup>+</sup>をジアセチレン膜フィルムに取り込ませ、特定の抗原を高感度に検出する。クロロホルム：メタノール=2：1の溶媒100mlに0.1~10.0mg/mlの濃度になるようにジアセチレンを溶かし、ラングミュアー-プロジェクト膜累積装置に広げた。形成されたフィルムは、オクチルトリクロシランで被覆したガラスに移した。このポリジアセチレン(pH8.0)膜を0.7×2.5cmのサイズのフィルムに1mg/mlの濃度の抗ヒト $\alpha$ -フェトプロテイン抗体の0.1Mリン酸バッファーに浸し、4℃で1時間反応させ、Fab<sup>+</sup>を含む抗ヒト $\alpha$ -

フェトプロテイン抗体のFab<sup>+</sup>を取り込んだポリジアセチレン膜を調製した。さらに、UV照射によってポリマー化した。このフィルム上に種々な濃度のヒト $\alpha$ -フェトプロテイン( $\alpha$ -AFP)(0.1~100 $\mu$ g/mlの濃度)を含む0.1Mリン酸バッファー20 $\mu$ lを加え、色調の変化を目視的に観察した。結果を表3に示すが、極めて低濃度から目視観察により定性分析することが認められた。

【0022】

【表3】

| $\alpha$ -AFPの濃度 (ng/ml) | 色の变化 |
|--------------------------|------|
| 0<br>(バッファーのみ)           | 無    |
| 0.1                      | 有    |
| 0.33                     | 有    |
| 1.0                      | 有    |
| 3.3                      | 有    |
| 10                       | 有    |
| 33                       | 有    |
| 100                      | 有    |

【0023】実施例4：HIVのエンベロウ蛋白(gp120)断片254-274(Cys-Thr-His-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Leu-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Glu)をジアセチレン膜のリボソームに取り込ませ、HIV抗体を高感度に検出する。クロロホルム：メタノール=2：1の有機溶媒100mlに0.1~2mg/mlの濃度になるようにジアセチレンを溶かし、容量500mlガラスコルベンに入れ、ガラス表面に均一にジアセチレン膜ができるようにコルベンを回転させながら25℃で有機溶媒を除去した。1~20 $\mu$ g/ml濃度のHIVのエンベロウ蛋白(gp120)断片254-274を含むトリス-HCl緩衝液(pH8.0)50

mlを加え、10分間激しく攪拌し、さらに超音波処理し、溶液を均一にし目的とするHIVのエンベロウ蛋白(gp120)断片254-274を取り込んだジアセチレン膜リボソーム50mlを調製した。これにUV照射してジアセチレンをポリマー化した。この0.2mg/mlのリボソーム溶液1mlに種々な濃度の不活性化HIV(0.1~1000pg/mlになるように)を加え、分光光度計(ベックマン社製紫外可視分光解析システムDV-640)で640nmの吸光度の変化を測定した。結果は表4と図3に示す。

【0024】

【表4】

| H I V の濃度 (pg/ml) | 吸光度変化 |
|-------------------|-------|
| 0                 | 0.000 |
| 1.0               | 0.018 |
| 3.0               | 0.032 |
| 10                | 0.078 |
| 33                | 0.152 |
| 100               | 0.311 |
| 330               | 0.641 |
| 1000              |       |

【0025】実施例5：H I V のエンベロウ蛋白 (gp120)断片254-274 (Cys-Thr-His-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Leu-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Glu)をジアセチレン膜を被覆した微粒子に取り込ませ、H I V 抗体を高感度に検出する。クロロホルム：メタノール=2：1の溶媒100ml に0.1～10mg/ml の濃度になるようにジアセチレンを溶かし、容量500ml ガラスコルベンに入れ、ガラス表面に均一にジアセチレン膜ができるようにコルベンを回転させながら25℃で有機溶媒を除去した。1～200  $\mu$ g/ml濃度のH I V のエンベロウ蛋白 (gp120)断片254-274 を含むトリス-HC1緩衝液 (pH8.0) 45mlと粒径0.212  $\mu$ m のポリスチレンラテックス (セラ

ダイン社、アメリカ)の0.5% (w/w)液5mlを同時に加え、10分間激しく攪拌し、さらに3分間超音波処理して、懸濁液を均一に分散させ、目的とするH I V のエンベロウ蛋白 (gp120)断片254-274 を取り込んだジアセチレン膜ポリスチレンラテックス50mlを調製した。これにUV照射しジアセチレンをポリマー化した。このラテックス懸濁液で100倍希釈し、この希釈懸濁液1mlに種々な濃度の不活性化H I V (0.1～10pg/ml になるように)を加え、分光光度計で640nm の吸光度の変化を測定した。結果は表5と図4に示す。

【0026】

【表5】

| H I V の濃度 (pg/ml) | 吸光度変化 |
|-------------------|-------|
| 0                 | 0.000 |
| 0.1               | 0.040 |
| 0.3               | 0.082 |
| 1.0               | 0.162 |
| 3.3               | 0.331 |
| 10                | 0.701 |

【0027】実施例6：H I V のエンベロウ蛋白 (gp120)断片254-274 (Cys-Thr-His-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Leu-Asn-Gly-Ser-Leu-Ala-Glu)をジアセチレン膜フィルムに取り込ませ、H I V 抗体を高感度に検出する。クロロホルム：メタノール=2：1の溶媒100ml に0.1～10.0mg/ml の濃度になるようにジアセチレンを溶かし、ラングミュアー-プロジェクト膜累積装置に広げる。形成されたフィルムは、オクテトリクロロシランで被覆したガラスに移した。このジアセチレン (pH8.0)膜を0.7×2.5cm のサイズのフィルムに1mg/ml の濃度のH I V のエンベロウ蛋白 (gp120)断片25

4-274 の0.1Mリン酸バッファーに浸し、4℃で1時間反応させ、H I V のエンベロウ蛋白 (gp120)断片254-274 を取り込んだジアセチレン膜を調製した。さらに、UV照射によってポリマー化した。このフィルム上に種々な濃度のH I V のエンベロウ蛋白 (gp120)断片254-274 (10～10000pg/mlの濃度)を含む0.1Mリン酸バッファー20 $\mu$ l加え、色調の変化を目視的に観察した。結果は表6に示す。

【0028】

【表6】



| H I V の濃度 (pg/ml) | 色の変化 |
|-------------------|------|
| 0.0<br>(バッファーのみ)  | 無    |
| 10                | 有    |
| 33                | 有    |
| 100               | 有    |
| 330               | 有    |
| 1000              | 有    |
| 3300              | 有    |
| 10000             | 有    |

【0029】実施例7：ポリジアセチレン膜にデオキシヌクレオチド（DNA）を取り込ませ、検体中の特定のDNAを高感度に簡便に検出する。実施例3の方法に準じて調製した種々な量（0.1～100pg）のプロブDNA（塩基の数：20mers, TATGCTTCGGCTCGTATGT）を取り込んだポリジアセチレン膜フィルムに相補的に反応する検体DNA（ATACGAAGGCCGAGCATACA）を含む液を20μl加えた。色調変化は全く見られなかった。次に2本鎖DNA

のみに反応する抗体を（10μg/ml）20μl加えて、60秒後の色調変化を目視的に観察した。結果は表7に示す。表7の結果は、2本鎖DNAに特異的に反応する抗体を使用することにより、検体中DNAを高感度、簡便に、迅速に検出できることを示している。

【0030】

【表7】

| 検体DNAの量(pg) | 2本鎖DNAに対する<br>抗体添加前の色調変化 | 2本鎖DNAに対する<br>抗体添加後の色調変化 |
|-------------|--------------------------|--------------------------|
| 0           | 無                        | 無                        |
| 0.1         | 無                        | 有                        |
| 0.3         | 無                        | 有                        |
| 1.0         | 無                        | 有                        |
| 3.3         | 無                        | 有                        |
| 10          | 無                        | 有                        |
| 33          | 無                        | 有                        |
| 100         | 無                        | 有                        |

【0031】

【発明の効果】ポリジアセチレン膜から成る本発明のセンサーは、汎用性があり、従来は検出できなかったようなリガンド（アナライト）を含む多くのリガンドを高感度に且つ簡便に検出することができる。本発明の発色センサーは、目的のリガンドが異なっても同様の条件で容易に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に従うポリジアセチレン膜リボソームを用いたα-AFPの検出試験の結果を示すグラフであ

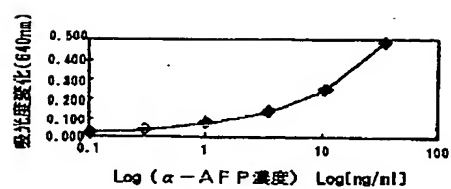
る。

【図2】本発明に従うポリジアセチレン膜被覆ポリスチレンラテックスを用いたα-AFPの検出試験の結果を示すグラフである。

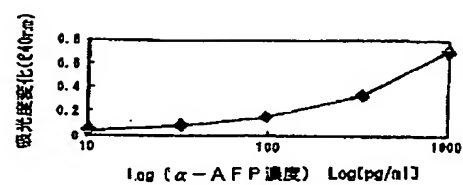
【図3】本発明に従うポリジアセチレン膜リボソームを用いたHIV抗体の検出試験の結果を示すグラフである。

【図4】本発明に従うポリジアセチレン膜被覆ポリスチレンラテックスを用いたHIV抗体の検出試験の結果を示すグラフである。

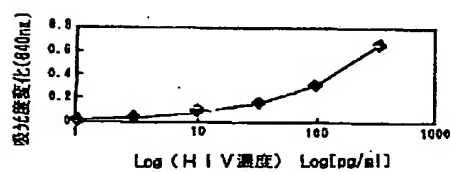
【図1】



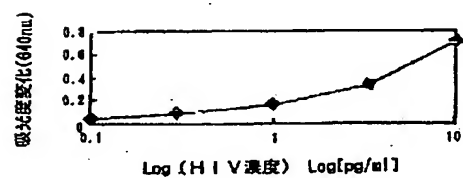
【図2】



【図3】



【図4】



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**